الف) مشخصات نمونه:

نام شرکت درخواست کننده: شرکت داروسازی کیمیا فام	**نام شرکت/کشور تولید کننده:** شرکت داروسازی کیمیا فام/ ایران
نوع فراورده: ضدعفونی کننده هوای محیط، سطوح و تجهیزات	**نام تجاری فراورده:** نانوسیل دی2 پلاس
تاریخ ساخت محصول: 1398/12	**شماره نامه درخواست:** 980/2422
تاریخ انقضاء محصول: 1400/12	**تاریخ نامه:** 98/12/17
حجم نمونه دریافت شده: 1000 میلی لیتر	**تاریخ صدور نتیجه آزمون:** 1398/12/25
شرایط و نوع بسته بندی نمونه: بطری پلی پروپیلن مات، سیل شده	**شرایط و نحوه مصرف** 1/10 رقیق شده
سری ساخت نمونه: D2P/SC001	**شرایط نگهداری محصول:** دور از نور آفتاب و در جای خشک و خنک
مواد تشکیل دهنده: پراکسید هیدروژن ، نیترات نقره و اسانس کاج	
رنگ و شکل و بو محصول: بی رنگ، کاملا شفاف و فاقد هر گونه ذرات معلق	

ب) اصول تست:

این مطالعه جهت بررسی فعالیت ضد ویروسی انجام می شود. محصول در صورتی از نظر استاندارد قابل قبول است که کاهش تعداد بار ویروسی (ویروس زنده) بیشتر از 4 واحد لگارتیمی (R≥4) برای هر ویروس بعد از هر کدام شرایط زیر مشاهده شود.

نوع محصول	زمان تماس
ضدعفونی کننده سطوح و تجهیزات (Instrument and surface disinfectants)	30 دقیقه
محلول بهداشتی و دستشوئی (Hygienic handrub and handwash)	1 دقیقه یا 30 ثانیه

زمان های مورد استفاده طبق استاندارد EN14476 می باشد در صورتیکه شرکت تولیدی، درخواست زمان های دیگری را داشته باشد، آزمایشگاه شرایط انجام زمان های اضافی را دارد.

پ) شرایط انجام آزمایش:

استاندارد مرجع مورد بررسی	EN 14476 (Phase 1)
میکروارگانیسمهای مورد مطالعه	A) Adenovirus B) Herpes Simplex Virus I (HSV-I)
رقت مصرفی در طول آزمایش	رقیق شده 1/10
ظاهر رقت های محصول	در تمامی رقت ها ظاهر محلول بی رنگ و شفاف بود
شرایط دما در هنگام آزمایش	20±1 °C
زمان تماس درخواست شده	1, 10, 30 min
دمای انکوباسیون	36±1 °C

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران
دانشکده بهداشت

تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶ - ۱۴۱۵۵ تلفن: ۴۲۹۳۳۳۳۳(۶۰ خط) نمابر: ۶۶۴۶۲۲۶۷

ج) روش انجام آزمایش:

1-1- تیتراسیون ویروس: در ابتدا، سوسپانسیون از رقت های ویروس تا 10^{-8} در محیط DMEM حاوی 2.5% سرم FBS تهیه شد. 100 میکرولیتر از هر رقت ویروس به 8 چاهک میکروپلیت حاوی سلول Vero یا RD اضافه شد. بعد از یک ساعت انکوباسون در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد با CO2 5%، 100 میکرولیتر محیط DMEM به هر چاهک اضافه شد. سپس طی دو روز اثرات سایتوپاتیک (CPE) ناشی از تکثیر ویروس بررسی گردید و نهایتا تیتر ویروس های آدنوویروس و هرپس سیمپلکس ویروس I، به روش اسپیرمن-کربر (Spearman-Karber) محاسبه شد.

1-2- تعیین غلظت سایتوکسیک محصول: هدف از این آزمایش، تعیین غلظت از محصول ضد عفونی کننده است که هیچ گونه علامتی از سمیت در رده سلولی ایجاد نمی کند تا آزمایش ویروس انجام شود. محصول 1/5 با آب دیونیزه رقیق شد سپس رقت های سریالی 10^{1}-10^{6} در محیط DMEM حاوی 2.5% سرم تهیه شد. سپس 100 میکرولیتر از هر رقت ویروس به 8 چاهک میکروپلیت حاوی سلول Vero یا RD اضافه شد. بعد از یک ساعت انکوباسون در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد با CO2 5%، 100 میکرولیتر محیط DMEM به هر چاهک اضافه گردید. نهایتا اثر سیتوتوکسیک محصول روی سلول ارزیابی شد.

1-3- تعیین حساسیت سلولی: هدف از این آزمایش این است که اطمینان حاصل شود که سلولهای Vero ترتیت شده با محصول، رفتار ویروس با سلولها را تغییر نمی دهند. 100 میکرولیتر از کمترین رقت غیر سیتوتوکسیک محصول مورد آزمایش به هر 8 چاهک کشت سلولی اضافه شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد با CO2 5%، انکوبه گردید. در همان زمان، سوسپانسیون از رقت های ویروس تا 10^{-8} در محیط DMEM حاوی 2.5% سرم FBS تهیه شد و 100 میکرولیتر از هر رقت در هر چاهک اضافه شد. میکروپلیت مجددا به مدت یک ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد با CO2 5%، انکوبه گردید. سپس طی دو روز اثرات سایتوپاتیک (CPE) ناشی از تکثیر ویروس بررسی گردید و نهایتا تیتر ویروس به روش اسپیرمن-کربر (Spearman-Karber) محاسبه شد.

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران
دانشکده بهداشت

تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶ - ۱۴۱۵۵ تلفن: ۴۲۹۳۳۳۳۳(۶۰خط) نمابر: ۶۶۴۶۲۲۶۷

4-1- تست کارائی کنترل غیرفعال سازی فعالیت محصول: بعد از آماده سازی مخلوط محصول و ویروس، 500 میکرولیتر از آن داخل 4.5 میلی لیتر محیط DMEM حاوی 2.5% سرم FBS سرد قرار داده شد. نهایتا از این مخلوط، تیتراسیون ویروس طبق بخش 1-1 انجام شد.

5-1- تعیین فعالیت ضد ویروسی محصول: حجم یک میلی لیتر (1ml) از ماده مداخله گر و حجم یک میلی لیتر (1ml) از ویروس مورد تست را داخل یک ظرف مخلوط می کنیم. سپس حجم یک میلی لیتر (1ml) محصول مورد آزمایش را به مخلوط بالا اضافه می کنیم و در حمام آبی با دمای $20+1^{oC}$ قرار می دهیم. بلافاصله در پایان زمان تماس انتخاب شده (زمان های 1، 10 و 30 دقیقه) تیتر ویروس به روش اسپیرمن-کربر (Spearman-Karber) محاسبه شد.

6-1- تست غیرفعالی سازی ویروس با اتانول 25%: برای کنترل رفتار سویه های ویروسی با عوامل شیمیائی، تست فعالیت ضد ویروسی با اتانول 25% نیز ارزیابی شد. این ارزیابی شامل مراحل 1-2، 1-4 و 1-5 می شود.

7-1- تیتر ویروس بعد از تریتمان با محصول: بلافاصله در پایان زمان تماس انتخاب شده (زمان های 1، 10 و 30 دقیقه) محصول مورد آزمایش با ویروس مورد نظر، تیتر ویروس به روش اسپیرمن-کربر (Spearman-Karber) محاسبه شد.

د) نتایج آزمون:

تیتر ویروس آدنوویروس: 7.8 Log TCID50/mL

سمیت محصول: نتایج نشان داد بدون Treatment، مواد ضد عفونی کننده سمیت 11. Log TCID50/mL را نشان داد.

حساسیت سلول: تفاوت بین تیتراسیون آدنوویروس بر روی سلول درمان شده (A و در سلول درمان نشده (B، پایین تر از 1 (جدول زیر) می باشد بنابراین نتیجه آزمایش معتبر است.

Adenovirus Titer	A: Treated Cell	B: Untreated Cell
Log TCID50/mL	6.9	7.5

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران
دانشکده بهداشت

تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶ - ۱۴۱۵۵ تلفن: ۴۲۹۳۳۳۳۳(۰۲۱) نمابر: ۶۶۴۶۲۲۶۷

خاصیت ضد آدنوویروسی ماده ضد عفونی کننده سطوح:

Product	Concentrations	Interfering Substance	Level of cytotoxicity (Log TCID50/mL)	Neutralization control (Log TCID50/mL)	Log TCID 50/mL) after			> 4 log reduction after .....
					60s	10 min	30 min	
Nanosil D2Plus	مستقیم	0.3g/L BSA	1.3	7.8	3.1	0.5	0.5	60s, 10 & 30 min
Ethanol	25%	PBS	1.0	7.6	7.5	6.5	4.5	N.A
Adenovirus control	N.A	PBS	N.A	7.8	7.5	6.2	5.6	N.A
Adenovirus control	N.A	0.3g/L BSA	N.A	7.8	7.6	7.0	6.8	N.A

PBS: Phosphate-buffered saline, BSA: Bovine serum albumin, N.A: Not Applicable

تیتر ویروس هرپس سیمپلکس ویروس: 7.1 Log TCID50/mL

سمیت محصول: نتایج نشان داد بدون Treatment، مواد ضد عفونی کننده سمیت 1.3 Log TCID50/mL را نشان داد.

حساسیت سلول: تفاوت بین تیتراسیون هرپس سیمپلکس ویروس بر روی سلول درمان شده (A و در سلول درمان نشده (B، پایین تر از 1 (جدول زیر) می باشد بنابراین نتیجه آزمایش معتبر است.

HSV-I Titer	A: Treated Cell	B: Untreated Cell
Log TCID50/mL	6.4	7.0

خاصیت ضد هرپس سیمپلکس ویروس ماده ضد عفونی کننده سطوح:

Product	Concentrations	Interfering Substance	Level of cytotoxicity (Log TCID50/mL)	Neutralization control (Log TCID50/mL)	Log TCID 50/mL) after			> 4 log reduction after .....
					60s	10 min	30 min	
Nanosil D2Plus	مستقیم	0.3g/L BSA	1.3	7.1	2.3	0.5	0.5	60s, 10 & 30 min
Ethanol	25%	PBS	1.0	7.1	6.9	6.5	6.0	N.A
HSV-1 control	N.A	PBS	N.A	7.0	6.8	6.2	5.6	N.A
HSV-1 control	N.A	0.3g/L BSA	N.A	7.1	7.0	7.0	6.8	N.A

PBS: Phosphate-buffered saline, BSA: Bovine serum albumin, N.A: Not Applicable

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران
دانشکده بهداشت

تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶ - ۱۴۱۵۵ تلفن: ۴۲۹۳۳۳۳۳(۰۲۱) نمابر: ۶۶۴۶۲۲۶۷

ز) نتیجه گیری:

جهت بررسی فعالیت ضد ویروسی محلول های ضد عفونی کننده، باید از ویروس پوشش دار و بدون پوشش استفاده کرد که در جدول زیر توضیح داده شده است.

شرایط تست	محلول ضد عفونی کننده	توضیحات
ویروس های مورد استفاده	انتروویروس ادنوویروس	هر دو ویروس بدون پوشش بوده که به عنوان نماینده خانواده ویروس های بدون پوشش مانند پولیوویروس، پاروویروس و نوروویروس در ارزیابی فعالیت محلول های ضد عفونی کننده مورد استفاده قرار می گیرد. اگر محلول ضد عفونی کننده روی این ویروس ها تاثیر قابل قبول طبق این استاندارد ایجاد کنند نشاندهنده تاثیر روی دیگر ویروس های بدون پوشش می باشد.
	هرپس سیمپلکس ویروس	یک ویروس پوشش دار بوده که به عنوان نماینده خانواده ویروس های پوشش دار مانند آنفلوآنزا، کروناویروس و HIV در ارزیابی فعالیت محلول های ضد عفونی کننده مورد استفاده قرار می گیرد. اگر محلول ضد عفونی کننده روی این ویروس تاثیر قابل قبول طبق این استاندارد ایجاد کنند نشاندهنده تاثیر روی دیگر ویروس های پوشش دار می باشد.

محصول ضد عفونی کننده سطوح (Nanosil D2Plus) در غلظت 10 برابر رقیق شده ، مطابق با استاندارد EN14476، دارای فعالیت ضد آدنوویروس در مدت زمان 60 ثانیه، 10 و 30 دقیقه و دارای فعالیت ضد هرپس سیمپلکس ویروس در مدت زمان 60 ثانیه، 10 و 30 دقیقه می باشد.

1- این گزارش بنا به درخواست شرکت مزبور جهت ارزیابی خاصیت ضد ویروسی محلول فوق توسط آزمایشگاه کنترل میکروبی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران صادر شده است و آزمایشگاه هیچگونه مسئولیتی در قبال ترکیبات و سایر خواص محلول از جمله سمیت و حساسیت پوستی و غیره ندارد.

2- محل نمونه برداری و نوع نمونه ارسالی به آزمایشگاه، هیچگونه ارتباطی با آزمایشگاه نداشته و کلیه مسئولیت های مربوطه طبق اظهار یا آورنده نمونه یا شرکت مربوطه است و نتیجه آزمون برای نمونه ارسالی به آزمایشگاه با مشخصات فوق معتبر است.

3- نتایج آزمون های انجام شده فقط برروی نمونه های دریافتی و در سر برگ و با مهر دانشکده و امضا مسئول فنی اعتبار دارد و کپی آن فاقد اعتبار می باشد.

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران
دانشکده بهداشت

تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶ - ۱۴۱۵۵ تلفن: ۴۲۹۳۳۳۳۳(۶۰ خط) نمابر: ۶۶۴۶۲۲۶۷